

慢性活動性肝炎患者血清の ADCC 誘導能と血清中の ADCC 抑制因子に関する研究

竹 内 秀 一

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Studies on ADCC Activity and ADCC Suppressive Factors in Sera of Patients with Chronic Active Hepatitis

Hidekazu TAKEUCHI

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) has been mainly given attention to the immunological mechanism of the pathogenesis of chronic active hepatitis. There are, however, many reports that patients with chronic active hepatitis have exhibited a decreased K cell activity when compared with normal controls. An investigation of the ADCC activity of sera from patients with chronic active hepatitis in the system of the Chang liver cell (CLC) as a target cell was made to elucidate the clinical significance of K cell activity from the viewpoint of liver specific antibody in sera.

Using this assay system, the positive ratio of ADCC activity was found to be much higher (75%) in sera of chronic active hepatitis than in the sera of other liver diseases. In addition to this investigation, the effects of absorption with CLC on ADCC activity by hepatitis sera were examined and an immunofluorescence study of these sera against rat liver was done. The presence of specific Ig G-antibody to the liver cell memberane antigen in sera of chronic active hepatitis was presumed. Therefore, the liver specific antibody in the sera of chronic active hepatitis was supposed to be a factor of the mechanism of ADCC *in vivo*. On the other hand, there were some cases showing negative ADCC activity in the sera of chronic active hepatitis in spite of the existence of liver specific antibody in their sera. These sera inhibited the erythrocyte-antibody rosette formation and K cell activity of normal human lymphocytes against the WFB-anti WFB antiserum system on ADCC. These results indicate the presence of an Fc receptor-blocking factor or factors, namely ADCC suppressive factors in the sera of some cases of chronic active hepatitis. Therefore, biochemical analyses of these factors were performed. That is to say, these sera were fractionated by Sephadex G-200 gel filtration and the suppressive effects of each fraction on the K cell activity of normal lymphocytes were investigated. Suppressive effects were mainly observed in the first fraction cor-

Abbreviations :

K cell : killer cell

ADCC : antibody dependent cell-mediated cytotoxicity

CLC : Chang liver cell

WFB : Wister-King-Aptekman-fibroblast

HMV : human melanoma cell from vagina

FCS : fetal calf serum

E/T : effector cell/target cell

EA : erythrocyte-antibody

SRBC : sheep red blood cell

I. C. : immune complex

HSA : human serum albumin

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Fr. : fraction

LSP : liver-specific protein

PBS : phosphate buffered saline

MLR : mixed lymphocyte reaction

BBS : borate buffered saline

responding to the void volume of Sephadex G-200 gel filtration. Immune complexes were mainly presumed to be the suppressive factors, because of affinity with the protein A column and because of the high value of immune complexes in the assay.

(Received October 13, 1982 and accepted December 13, 1982)

Key words: ADCC-suppressive factor, Chronic active hepatitis, Chang liver cell, Immune complex

1 緒 言

慢性活動性肝炎における肝細胞崩壊の機序については、液性免疫と細胞性免疫の両面から解明がなされつつある。慢性活動性肝炎では血中のHB_e抗原の有無にかかわらず肝細胞膜成分と反応する自己抗体が存在することが報告されている¹⁻⁵⁾。これら抗体と効果細胞(effector cell)であるKiller cell (K cell)を介するantibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)の肝細胞障害機構が注目されている^{6,7)}。ADCCは、標的細胞(target cell)の膜表面抗原に、その特異的抗体が結合し、その抗体のF_c部分にF_cレセプターを介してK cellが付着し、三者の協同作用により*in vitro*に惹起される細胞障害性である。しかし、慢性活動性肝炎におけるK cellの動態に関しての多くの報告は、ヒツジ赤血球一抗ヒツジ赤血球抗体を用いた実験系で実施され⁸⁻¹¹⁾、肝細胞を標的細胞とした場合の検討は殆どされていない。さらに慢性活動性肝炎患者血清のADCC誘導能すなわち特異抗体とその細胞障害性の有無に関しては不明な点が多い。加えて一般的にeffectorとなるK cellの起源によりADCC活性に差(種属差)があることも確認されている¹²⁾。従って*in vivo*における肝細胞障害機構を論ずる時は、各々の因子が*in vivo*に近い実験系で実施される必要があると思われる。本論文では、慢性活動性肝炎患者におけるADCC活性を検討するためにK cellの起源を患者末梢血リンパ球とし、特異抗体の起源として患者血清を、さらに標的細胞としてヒト由来培養肝細胞であるChang liver cell (CLC)を用いて検索し、その臨床的意義を考察した。さらに患者血清中に肝細胞に対する特異抗体を認めながらもADCC活性を抑制する血清の存在を認めたため、そのADCC活性抑制因子の生化学的分析を実施し、知見を得たので合わせて報告する。

2 研究対象ならびに研究方法

2.1 研究対象

札幌医科大学第四内科に入院あるいは外来通院中の急性肝炎患者17例、慢性活動性肝炎14例、慢性非活

動性肝炎19例、肝硬変12例、および対照として臨床的に健康と認めた正常人15例を対象とし、末梢血リンパ球および血清を静脈より採取した。各群の年齢構成は20歳から70歳であり、血液生化学的検査、肝生検にて診断を確定した症例を用いた。原則として免疫抑制剤長期使用者、活動性感染症を有する者は除外した。

2.2 研究方法

2.2.1 培養細胞および、その抗血清の作成法

2.2.1.1 培養細胞および培養液の作成法

以下の4種類の培養細胞を用いた。すなわち正常ヒト肝細胞由来の培養細胞であるChang liver cell (CLC, Flow Laboratory)、札幌医大病理学第1講座より供与を受けたWister-King-Aptekman (WKA) rat胎児由来の培養細胞WKA-線維芽細胞(WFB)、同教室で株化したヒトメラノーマ細胞由来の培養細胞HMV (Human Melanoma cell from Vagina)、およびヒト単球性白血病由来の培養細胞J-III (大日本製薬株式会社)を用いた。これらの培養細胞はいずれもDulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (Eagle MEM) (GIBCO Lab.)に10%非働化したFetal Calf Serum (FCS)、ペリシリンG100unit/ml、ストレプトマイシン100 μg/mlを加えた培養液で継代維持した。

2.2.1.2 培養細胞に対する抗血清の作成法

CLCおよびWFBを用い家兎に免疫し作成した。両細胞の各々 2×10^7 個を家兎耳静脈に静注し、1週目、2週目に同量の細胞で追加抗原刺激し、3週目に血清を採取した。採取後ただちに30分間56℃に置いて血清を非働化し、使用時まで-70℃の冷凍庫に保存した。

2.2.2 各種肝疾患患者末梢血中のK cell活性の測定法

標的細胞をCLCとし、抗CLC抗血清を抗体とし肝疾患患者および正常人末梢血リンパ球を効果細胞としてADCCアッセイをTakasugi and Kleinの方法¹³⁾で実施し、K cell活性を測定した。すなわちFalcon 3034 microplateの各wellに 2×10^4 個/mlに調整したCLCを20 μl, well 当り400個を正確に入れ、24時

間, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養し, 細胞を well の底面に良く付着させた。次に各 well 内の培養液を吸引した後, 非働化抗 CLC 抗血清を至適希釈倍数を 10⁻⁴倍とし, 各 well に 20 μl ずつ添加し, 同インキュベーター内で 1 時間反応させた。肝疾患患者および正常人末梢血をヘパリンを加えて採血し, Ficoll-Isopaque による比重遠心法にてリンパ球層を分離し, 生理食塩液で 1 回, 培養液にて 2 回洗浄後, プラスチック培養瓶内に 37°C, 1 時間浮遊させ, adherent cell を除去することにより調整し, 効果細胞として以下の実験に使用した。adherent cell はペルオキシダーゼ染色陽性細胞 88%, ラテックス食食陽性細胞 84% であった。前述の well 内の抗血清を吸引除去した後 1×10⁶個/ml に調整した効果細胞を各 well に 20 μl すなわち well 当たり 2×10⁴個を添加し効果細胞と標的細胞の比 (E/T 比) を 50 対 1 とした。この microplate を 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養後, 生理食塩液をプレート内に入れ, 約 20 回左右に振盪し, 死細胞, 効果細胞を除去した。その後 well の底面に良く乾燥させ, メタノール固定後, ギムザ染色を施し well 底に付着した標的細胞数を顕微鏡下で算定した。K cell 活性は次式より算出した。

Percent cytotoxicity =

$$\frac{\left(\frac{\text{リンパ球・抗体無添加}}{\text{well 平均標的細胞数}} \right) - \left(\frac{\text{リンパ球・抗体添加}}{\text{well 平均標的細胞数}} \right)}{\left(\frac{\text{リンパ球・抗体無添加}}{\text{well 平均標的細胞数}} \right)} \times 100$$

2.2.3 肝疾患患者血清の ADCC 誘導能の特異性に関する検討法

2.2.3.1 ADCC アッセイの標的細胞特異性の検討法

標的細胞を CLC, J-III, および HMV とし, 効果細胞に正常人末梢血 adherent cell 除去リンパ球を用い, 急性肝炎, 慢性活動性肝炎, 慢性非活動性肝炎, 肝硬変計 43 例の患者血清を抗体の起源とし, 非働化して使用した。E/T 比は 50 対 1 とし, 患者血清は前述の培養液で 5 倍に希釈し, 2.2.2 の方法に準じて Takasugi and Klein の方法でアッセイを行った。Percent ADCC は以下の式により求めた。

Percent ADCC =

$$\frac{\left(\frac{\text{正常血清・リンパ球添}}{\text{加 well 平均標的細胞数}} \right) - \left(\frac{\text{患者血清・リンパ球添}}{\text{加 well 平均標的細胞数}} \right)}{\left(\frac{\text{正常血清・リンパ球添加}}{\text{well 平均標的細胞数}} \right)} \times 100$$

2.2.3.2 間接蛍光抗体法による患者血清中の肝特異抗体の検討法

WKA ラットの肝・腎・心および胃より -20°C の条件下で切片の厚さ 6~8 μm の凍結切片標本を作製し, 室温で乾燥した後, 5 分間アセトン固定を行った。一次抗体に患者あるいは正常人血清を 10 倍に希釈して用い, 各々の組織切片と 30 分, 室温にて moist chamber 中で反応させ phosphate buffered saline (PBS) にてそれぞれ 5 分, 3 回洗浄した。二次抗体はあらかじめヒト赤血球で等量吸収した fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ウサギ抗ヒト IgG を 10 倍希釈して用い, 同様の条件で反応させて PBS にて洗浄し次に PBS-glycerin buffer を少量, 切片上に載せカバーガラスを被せ蛍光顕微鏡下にて鏡検して判定した。

2.2.3.3 患者血清の各種培養細胞による吸収試験の検討法

ADCC 誘導能を有する慢性活動性肝炎患者の血清を用い, CLC, J-III で吸収を行った。吸収方法は各々の遠心後沈澱した細胞 packed cell に等量の患者血清 1 ml を加え 1 時間, 4°C に放置し, 2,500 rpm, 15 分間遠心後上清を再び新しい packed cell に加え, 同様の操作を計 5 回繰り返した。吸収後 2.2.3.1 の方法で Percent cytotoxicity を算定し比較検討した。

2.2.4 各種肝疾患患者血清の ADCC 誘導能の測定法

標的細胞を CLC とし, 効果細胞に正常人末梢血 adherent cell 除去リンパ球を用い急性肝炎 17 例, 慢性活動性肝炎 14 例, 慢性非活動性肝炎 19 例, 肝硬変 8 例, の血清で 2.2.3.1 の方法に準じてアッセイを行った。血清の ADCC 誘導能の経時的変動は急性肝炎 3 例, 慢性活動性肝炎 4 例を対象とし, 血液生化学的諸検査と比較検討した。

2.2.5 ADCC 抑制因子の分析法

2.2.5.1 肝疾患血清による K cell 活性抑制効果の検討法

2.2.5.1.1 Erythrocyte-antibody (EA) ロゼット形成抑制試験

2.5% ヒツジ赤血球 (sheep red blood cell, SRBC) を 600 倍に希釈したウサギ抗 SRBC 血清と 30 分, 37°C にて反応させ, その後 PBS を適当量加え, 2,500 rpm, 5 分間遠心洗浄した。遠心後沈澱した細胞を PBS で希釈し 0.5% EA 液を得た。次に 2.2.2 の方法に準じて正常人末梢血リンパ球を分離し, adherent cell を除去した後, 2×10⁶個/ml に調整したリンパ球液 0.25 ml に患者あるいは正常人血清 0.05 ml を加え, 4°C, 1 時間反応させた後 PBS にて血清を洗浄置換後 1×10⁶個/ml に調整した。この処置リンパ球液と等量の 0.5% EA 液

を加え、1,000 rpm, 5 分間遠心後、37℃に1時間放置しロゼット形成細胞を算定した。

2・2・5・1・2 標的細胞として WFB を用いた K cell 活性抑制試験

WKA ラット胎児由来の線維芽細胞 (WFB) を標的細胞として実施する K cell 活性測定法を応用して検討した。すなわち 2・2・2 の方法で WFB を microplate の well に付着させ、well に 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍に希釈した抗 WFB 抗血清を加え、37℃、1 時間、5% CO_2 インキュベーターにて培養し、この抗 WFB 抗血清を除去した後 2・2・5・1・1 と同様に患者あるいは正常人血清で処理した正常人末梢血 adherent cell 除去リンパ球を培養液で 1×10^6 個/ml に調整し 20 μl ずつ各 well に重層し、48 時間、37℃、5% CO_2 インキュベーターにて培養し 2・2・2 の方法で % ADCC を算出した。

2・2・5・2 immune complex (I. C.) 測定と K cell 活性および ADCC 誘導能との相関に関する検討法

血清 I. C. の測定は Pereira *et al.*¹⁴⁾ により開発された固相化抗 C_3 ラジオイムノアッセイ法を応用した。すなわち 220-24 K ディスポ U プレート (三光純薬) に抗 C_3 抗体の $\text{F}(\text{ab}')_2$ を固相化し、次に $\text{F}(\text{ab}')_2$ -anti- C_3 を吸引除去後 1% ヒト血清アルブミンホウ酸緩衝食塩液 (HSA-BBS) を加え 1 時間インキュベートした後、BBS で 1 回洗浄した。次いで 1% HSA-BBS, 0.01M Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt (EDTA 2 Na) 溶液で 20 倍希釈した患者血清を加え、37℃で 2 時間インキュベートした。次いで BBS で 5 回洗浄し、クロラミン T 法で標識化した抗ヒト IgG 抗体を加え、さらに 37℃、2 時間インキュベートした後、BBS にて 5 回洗浄し乾燥後、各 well の放射活性を測定した。標準曲線はヒト aggregated Ig G (AHG) を使用して作成した。すなわち、上述した I. C. の測定法において患者血清の代りに AHG と 1% HSA-BBS で 20 倍希釈した正常血清とを、あらかじめ 37℃、15 分間インキュベートして使用した。K cell 活性、血清の ADCC 誘導能および I. C. を同一患者で各々測定し、その相関について統計処理を行った。

2・2・5・3 血清のセファデックス G 200 ゲル濾過と ADCC 抑制因子の分析に関する検討法

2・2・5・3・1 血清のセファデックス G 200 ゲル濾過の実施法

肝特異抗体を証明し、且つ K cell 活性および EA ロゼット形成の抑制作用を示した慢性活動性肝炎患者血清 2 ml を試料とし、あらかじめ 0.001 M Tris-HCl

buffer, pH 8.0 で平衡化したセファデックス G 200 (Pharmacia 社製) カラム (2.5×100 cm) でゲル濾過を行った。ゲル濾過は upward flow にて実施し、流速 10 m/hr. とし 3 ml ずつ分画採取し、分画後蛋白質の吸収として波長 280 nm における吸光度を測定した。

2・2・5・3・2 セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画の K cell 活性抑制試験法

WFB を標的細胞とし 10^{-6} 倍に希釈した非働化抗 WFB 抗血清を用い、正常人末梢血 adherent cell 除去リンパ球を 2×10^6 個/ml に調整し使用した。この効果細胞浮遊液 0.25 ml にセファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画を濃縮後、蛋白量 10 mg/ml に調整し、その各々 0.05 ml を加え、4℃、1 時間反応させた。その後この処置効果細胞を培養液で 3 回洗浄し、 1×10^6 個/ml に調整して用いアッセイは 2・2・5・1・2 に準じて実施した。

2・2・5・3・3 セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画の immune complex (I. C.) の測定法

セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画を濃縮後、蛋白量を 10 mg/ml に調整し、試料とした。I. C. は 2・2・5・2 の方法に従い測定した。

2・2・5・3・4 セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の実施法

セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画を濃縮後、蛋白量を 10 mg/ml に調整し同様に試料とした。SDS-PAGE は Maizel¹⁵⁾ の方法に準じて実施した。すなわちゲルの組成は 6.5% アクリルアミド、0.131% Bis, 0.03% TEMED, 0.09% 過硫酸アンモニウム、0.4 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 で直径 0.5 cm, 長さ 7.5 cm のガラスチューブを使用した。試料は 25% sucrose で等量に希釈しゲルの上に重層した。泳動用緩衝液は 0.005 M Trisma base, 0.038 M glycine 溶液 (pH 8.3) を用いディクス電気泳動装置 (ミツミ科学産業株式会社) で 200 V, 3 時間泳動した。染色は 0.063% Coomassie ブリリアントブルー R 250, 11.7% トリクロール酢酸 (TCA) 溶液で、脱色は 10% 酢酸溶液で行った。

2・2・5・3・5 セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画のプロテイン A セファロース アフィニティ クロマトグラフィーの実施法

セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画の中から tube number 56-63, 66-77, 85-94, 102-105 を集め、各々を Fr. I, Fr. II, Fr. III, Fr. IV とした。各々の Fraction を濃縮後、プロテイン A セファロース

(Pharmacia 社製)カラムクロマトグラフィーを実施した。あらかじめ 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 にて平衡化したプロテイン A セファロース カラム (1.5×30 cm) に Fr I, Fr II, Fr III および Fr IV を各々 20 mg 添加し, 15 ml/hr の流速で 2 ml ずつ分画採取した。分画後波長 280 nm における吸光度を測定し, 初めのピークが十分に溶出されたことを確認後緩衝液を 0.1 M glycine-HCl 緩衝液 (pH 3.0) に置換し, 再び同様に操作し波長 280 nm における吸光度を測定した。

2.2.5.3.6 プロテイン A セファロース アフィニティ クロマトグラフィー後の各分画の K cell 活性抑制作用の検討法

プロテイン A セファロース アフィニティ クロマトグラフィー後の各分画を 0.01 M PBS に透析濃縮後, 蛋白量を 10 mg/ml に調整し 2.2.5.1.2 に従い K cell 活性抑制作用を検討するために各々の分画 0.05 ml を 2×10^6 個/ml に調整した効果細胞液 0.25 ml と 4℃, 1 時間反応させ洗浄後, アッセイに使用し, その抑制作用を検討した。

3 研究結果

3.1 各種肝疾患患者末梢血中の K cell 活性

3.1.1 標的細胞を CLC とし抗 CLC 抗血清を用いた K cell 活性の基礎的検討

効果細胞と標的細胞の比 (E/T 比, を 50:1 と一定にし, 標的細胞に対する抗血清を 10 倍ずつ段階的に希釈して細胞障害に対する抗血清の濃度の影響を正常人末梢血 adherent cell 除去リンパ球を用いて検討した。Fig. 1 にその結果を示した。図中の斜線領域は natural killing (NK) と考えられる抗血清非存在下の平均 Percent cytotoxicity $\pm 2SD$ の範囲を示している。図に示すように 10^{-4} 倍希釈まで有意に高い細胞障害性が認められた。この結果から CLC に対する K cell 活性の測定は抗血清を 10^{-4} 倍に希釈したものを E/T 比を 50:1 として実施した。

3.1.2 各種肝疾患患者末梢血中の K cell 活性

標的細胞を CLC, その特異抗体を用いた時の K cell 活性の結果を Fig. 2 に示した。その結果, 正常人 12 例の K cell 活性は $67.1 \pm 15.3\%$ であるのに対し, 慢性活動性肝炎 10 例は $34.9 \pm 14.5\%$, 慢性非活動性肝炎 10 例は $59.3 \pm 16.3\%$, 肝硬変 9 例で $48.3 \pm 21.5\%$, および急性肝炎 11 例で $48.0 \pm 20.1\%$ と慢性活動性肝炎患者の K cell 活性は正常人および他の肝疾患に比較して有意に低下していた ($P < 0.001$)。

3.2 肝疾患患者血清の ADCC 誘導能の特異性に関する検討

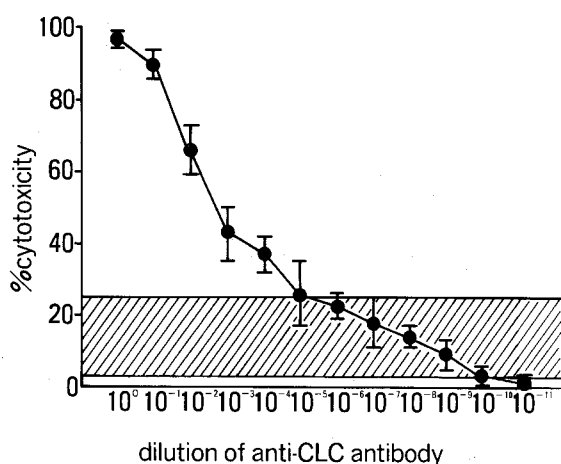


Fig. 1 Effect of concentration of anti-CLC antibody on ADCC against CLC. The shadow area represents natural killing.

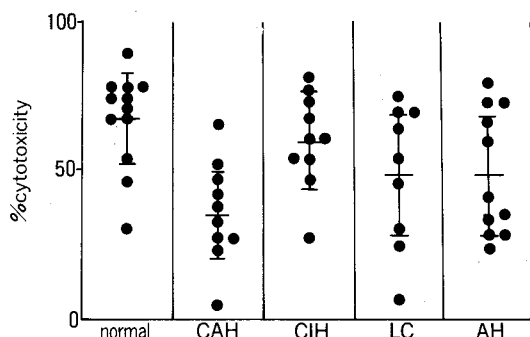


Fig. 2 K cell activity of peripheral blood lymphocytes in hepatic diseases.
CAH : chronic active hepatitis,
CIH : chronic inactive hepatitis,
LC : liver cirrhosis,
AH : acute hepatitis.

る検討

3.2.1 各種培養細胞に対する血清の ADCC 誘導能の発現率

各種標的細胞 CLC, J-III, HMV に対する血清の ADCC 誘導能は正常人 15 例の血清を用いた場合 mean $\pm 2SD$ は $\pm 17.9\%$ であった (斜線領域)。そこで, この値以上を ADCC 活性陽性とする。肝疾患患者血清を用いた場合の ADCC 誘導能は Fig. 3 に示すように標的細胞が CLC の場合 43 例中 22 例 51.2% が陽性を示した。一方, 標的細胞が J-III の場合, 陽性例は 43 例中 5 例 11.6%, HMV の場合 43 例中 4 例 9.3% であった。肝疾患患者血清の ADCC 誘導能の発現は標的細胞が CLC の場合に高率であり標的細胞選択性を認めた。

3・2・2 ラットの各臓器組織に対する肝疾患血清の免疫蛍光所見と ADCC 誘導能との関連

各種肝疾患患者 51 例の血清および正常人对照血清につき、ラット肝、腎、心および胃の凍結組織切片への IgG 抗体の結合特異性を検討した。Table 1 に示すように 22 例の血清が肝に対し Fig. 4 のような蛍光陽性所見を呈した。この内、肝にのみ蛍光陽性所見を呈したのは 8 例であった(○印)そこでこれら 8 例の血清の ADCC 誘導能を検討した。Table 1 に示すように標的細胞が CLC の場合患者番号 (Pt. No.) 9, 11, 29, 35, 39 の

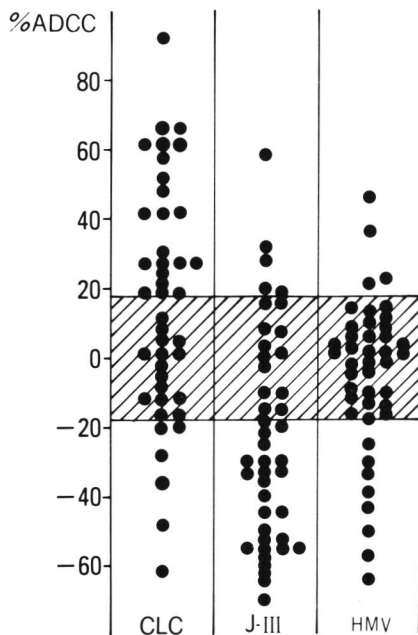


Fig. 3 ADCC activity of sera from liver disease patients against CLC, J-III and melanoma cells (HMV).

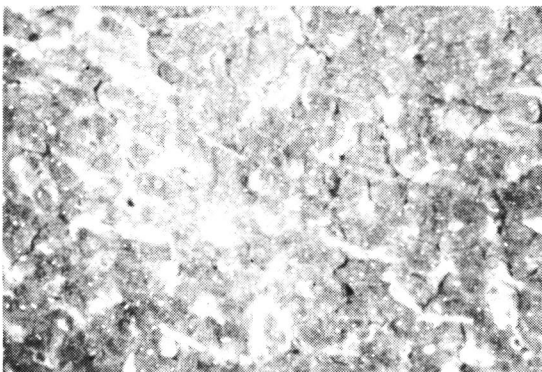


Fig. 4 Immunofluorescence of a serum from a patient with chronic hepatitis against rat liver.

5 例に ADCC 誘導能が陽性であり、その値は各々 29.7, 18.3, 86.3, 19.3, 25.0%であった。一方 Pt. No. 7, 13, 51 では活性が各々 -13.6, -19.4, 3.5%と ADCC 誘導能が陰性であった。従って 8 例の血清中 5 例, 62.5%に ADCC 誘導能が認められた。これは Fig. 6 にて示した慢性肝疾患血清の ADCC 誘導能陽性率 46.2%と比べて明らかな有意差 ($P < 0.001$) をもって高率であった。従って CLC に対する ADCC 誘導能と肝組織に対する蛍光所見とは強い関連性が認められた。

3・2・3 CLC による吸収試験後血清の ADCC 活性

CLC に対して 66.7%, J-III に対して 11.8%の ADCC 誘導能を示した慢性活動性肝炎患者血清を用いた。この血清 1 ml を CLC で吸収し ADCC 誘導能を検討すると Fig. 5 に示すように標的細胞が J-III の場合 ADCC 誘導能の変動は認められず、この血清の ADCC 誘導能は CLC に特異的であると考えられた。

3・3 各種肝疾患患者血清の ADCC 誘導能

3・3・1 各種肝疾患患者血清の ADCC 誘導能

Fig. 6 に示したように標的細胞を CLC とした場合の ADCC 誘導能の発現は慢性活動性肝炎血清で 12 例中 9 例 (75.0%), 慢性非活動性肝炎血清で 19 例中 8 例 (42.1%), 肝硬変血清で 8 例中 1 例 (12.5%), 急性肝炎血清で 17 例中 7 例 (41.2%) が陽性であった。従って肝疾患患者血清の中では慢性活動性肝炎患者血清の ADCC 誘導能の発現が高率に認められた。

3・3・2 各種肝炎患者血清の ADCC 誘導能と臨床経過との関連

急性肝炎 3 例と慢性活動性肝炎 4 例の血清の ADCC 誘導能と、それらの臨床経過との関連を検討した。急性肝炎症例はすべて HB_s 抗原陽性、ほぼ 6-8 週で治癒したと認められた症例であった。Fig. 7 にこれら症例の血清トランスアミネース値と血清の ADCC 誘導能を

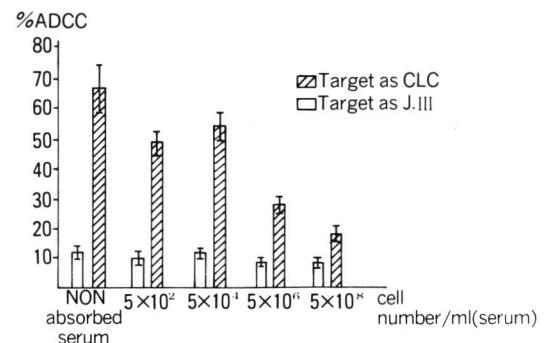


Fig. 5 Effect of absorption with CLC on ADCC activity by hepatitis sera.

Table 1 Immunofluorescence cryo-cut tissue specimens of hepatitis patients.

Pt. No.	liver	kidney	heart	stomach	ADCC	
					CLC	J-III
○ 7	+	—	—	—	—13.6	—54.1
○ 9	++	—	—	—	29.7	—30.9
○ 11	+	—	—	—	18.3	—16.9
○ 13	+	—	—	—	—19.4	—57.3
14	+	—	+	—	—19.4	—52.3
15	++	+	++	—	—17.1	—60.5
17	++	—	+	—	—37.7	—53.2
18	++	++	+	+	—48.6	—49.5
19	+	+	+	—	22.9	—59.1
20	++	++	—	+	18.9	—44.5
26	+	++	+	—	62.7	17.1
27	+	+	+	—	62.6	— 2.4
28	+	+	+	—	62.1	22.3
○ 29	+	—	—	—	86.3	57.9
32	+	+	—	—	66.4	31.5
○ 35	+	—	—	—	19.3	—67.5
36	+	—	+	—	11.8	—14.2
38	+	—	+	—	3.4	—54.5
○ 39	+	—	—	—	25.0	—14.9
42	+	+	—	—	58.6	21.1
45	++	++	—	—	3.1	—22.9
○ 51	+	—	—	—	3.5	—10.3

示したが、血清トランスアミネース値はいずれも発症時の高値が経過と共に減少したのに反し ADCC 誘導能は終始低値の傾向にあり、発症時と同程度の値を維持し、且つ血清トランスアミネース値とは一定の関係を認めなかった。一方、慢性活動性肝炎 4 例中 3 例に ADCC 誘導能が血清トランスアミネース値の上昇に先立ち陽性となり、その後、軽快増悪に並行する推移を示した。Fig. 8a, 8b, 8c, にその臨床経過を示した。Fig. 8a の症例は HB_s 抗原陽性で肝機能障害が遷延し 1 年後の肝生検で慢性活動性肝炎と診断された症例である。入院時、血清の ADCC 誘導能は低値を示していたが、その後 3 週、48 週の血清トランスアミネース値の

上昇に先立ち、陽性となりその後の血清トランスアミネース値の増減と並行して変動した。Fig. 8b は HB_s 抗原陽性の急性肝炎であったが初診より約 50 週後の肝生検で慢性活動性肝炎と診断された症例である。50 週目の血清トランスアミネース値の上昇に先立ち ADCC 誘導能が陽性となり、以後は両者の値はほぼ並行した。Fig. 8c は初診より 3 週目の肝生検で慢性活動性肝炎と診断された症例である。14 週目の血清トランスアミネース値の上昇に先立ち、10 週目より ADCC 誘導能が陽性となり、以後の両者の値はほぼ並行した。しかし、慢性活動性肝炎 4 例中 1 例は約 1 年間の観察期間中、血清トランスアミネース値に代表される臨床経過と血清

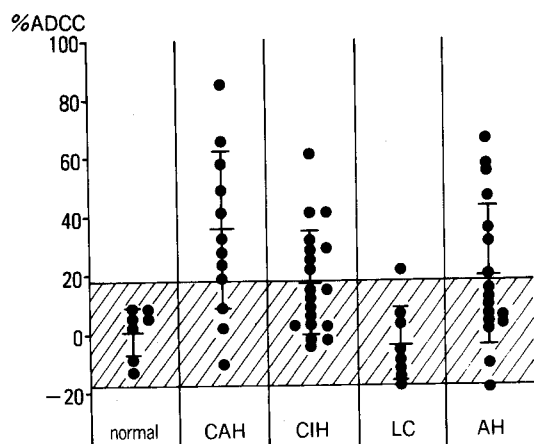


Fig. 6 ADCC activity of sera from liver disease patients against CLC.

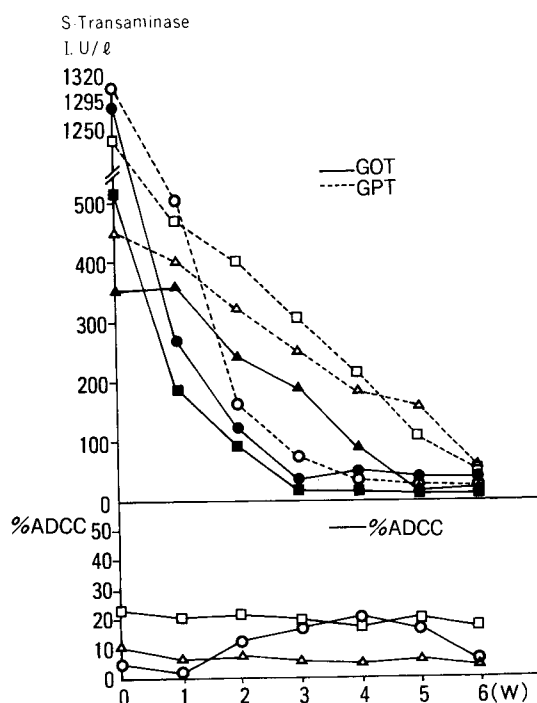


Fig. 7 Relationship between serum transaminase and ADCC activity of sera in patients with acute hepatitis.

の ADCC 誘導能とは相関する推移を示さなかった(Fig. 8d).

3・4 肝疾患患者血清の K cell 活性抑制の検討

3・2・2 で示したように肝疾患患者血清が蛍光抗体法で肝にのみ特異的に陽性所見を示しながら CLC を標的細胞とした ADCC 誘導能の発現を認めなかった Pt. No.

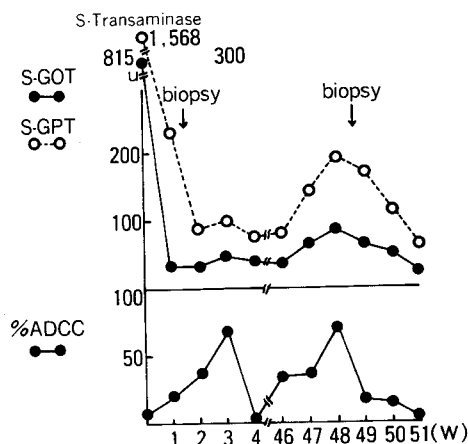


Fig. 8a Relationship between serum transaminase and ADCC activity of sera in patients with chronic active hepatitis.

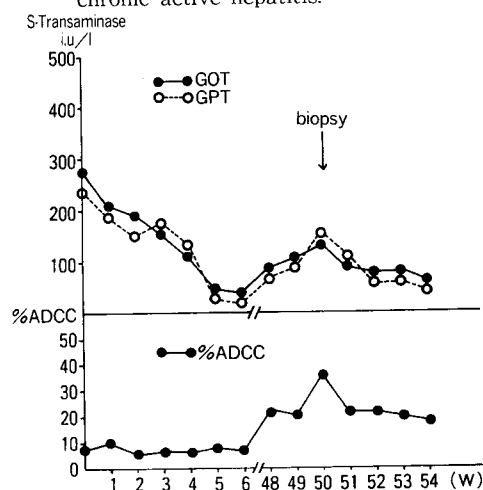


Fig. 8b Relationship between serum transaminase and ADCC activity of sera in patients with chronic active hepatitis.

7, 13, 51 (Table 1) 3 例と、対照として肝組織の蛍光所見も ADCC 誘導能も陰性であった Pt. No. 46 の血清について検討した。

3・4・1 EA ロゼット形成抑制試験

Table 2 に示したように 4 例の患者血清のロゼット形成は正常人血清の処理による平均値 13.5% に対し patient No. 7 は 4.5%, No. 13 は 8.0%, No. 46 は 13.0%, No. 51 は 6.5% と肝硬変の患者 No. 7, No. 13 および慢性活動性肝炎患者 No. 51 の血清は明らかにロゼット形成を抑制した ($P < 0.001$).

3・4・2 WFB への K cell 活性抑制試験

WFB を標的細胞とし、正常人末梢血 adherent cell

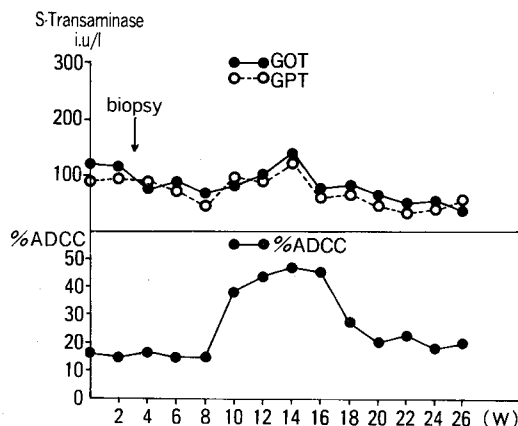


Fig. 8c Relationship between serum transaminase and ADCC activity of sera in patients with chronic active hepatitis.

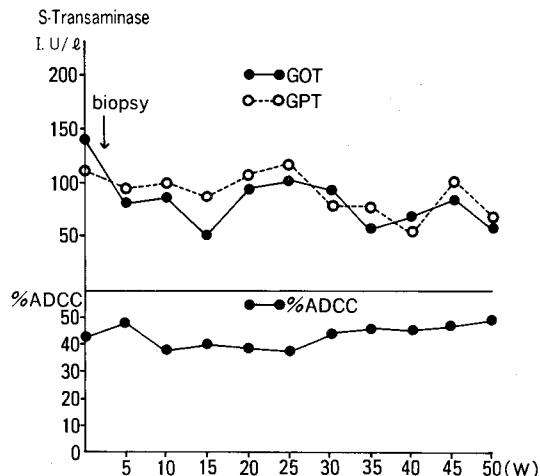


Fig. 8d Relationship between serum transaminase and ADCC activity of sera in patients with chronic active hepatitis.

Table 2 Blocking effect of EA rosette formation and killer activity by sera from patients with hepatic diseases.

	ADCC against CLC	specific immunofluorescence for rat liver	Exp. 1	Exp. 2	mean	ADCC suppression against WFB
control	—	—	12%	15%	13.5%	70%
No. 7	—	+	3%	6%	4.5%	31%
No. 13	—	+	8%	8%	8.0%	30%
No. 46	—	—	10%	16%	13.0%	75%
No. 51	—	+	5%	8%	6.5%	28%

除去リンパ球を効果細胞として、抗 WFB 家兔血清を抗体とした ADCC アッセイ系での患者血清の効果細胞処理による影響を検討した。Table 2 に示すように ADCC 活性は Pt. No. 7 の血清の処理にて 31%, No. 13 で 30%, No. 51 で 28% と対照血清に比較して明らかに低値を示した。

3.5 Immune complex (I. C.) と ADCC 誘導能との関連

3.5.1 肝疾患血清中の I. C. 値

各種肝疾患血清中の I. C. を Pereira *et al.*¹⁴⁾ の方法で測定した。Fig. 9 に示すように正常人血清中には I. C. は検出されず、慢性活動性肝炎では $116.1 \pm 90.4 \mu\text{g/ml}$ 、慢性非活動性肝炎では $52.1 \pm 47.1 \mu\text{g/ml}$ 、肝硬変では $86.6 \pm 84.1 \mu\text{g/ml}$ 、および急性肝炎では $43.4 \pm 39.7 \mu\text{g/ml}$ であり、とくに慢性活動性肝炎で高値を示した。

3.5.2 I. C. と肝疾患の K cell 活性との相関

同一肝疾患患者につき 2・2・2 の方法による K cell 活

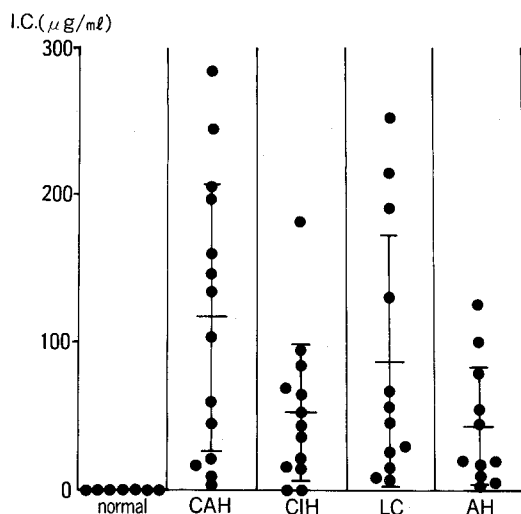


Fig. 9 Serum concentration of immune complexes (I. C.) in hepatic diseases.

性と、2・2・5・2の方法による血清中のI. C. 値とを測定した17例について両者の相関を検討した。Fig. 10に示すように、その相関係数は -0.555 であって、I. C. が高値を示すにつれて若干、K cell 活性が低値を示す、すなわち逆相関の傾向を認めた。

3・5・3 I. C. と肝疾患患者血清のADCC誘導能との相関

肝疾患患者血清のADCC誘導能とI. C. とを同時に測定し得た症例につき両者の相関を検討しFig. 11に示した。相関係数 0.269 と両者の相関は認められなかった。

3・6 K cell 活性抑制を示した血清の分析

3・6・1 セファデックス G 200 による検討

No. 7, No. 13 および No. 51 の症例の血清をセファデックス G 200 を用いてゲル濾過を実施し、各分画につき2・2・5・1・2の方法でK cell 活性抑制作用を、2・2・

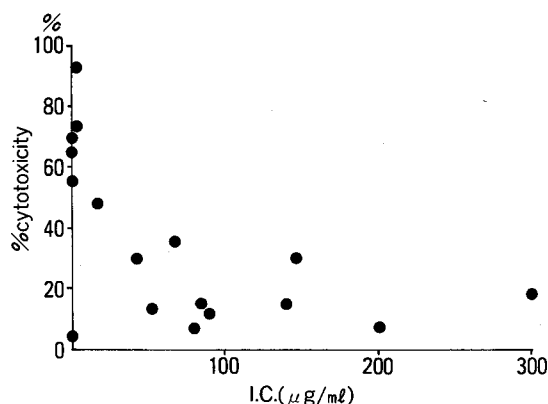


Fig. 10 Relationship between K cell activity of peripheral blood lymphocytes and immune complexes (I. C.)

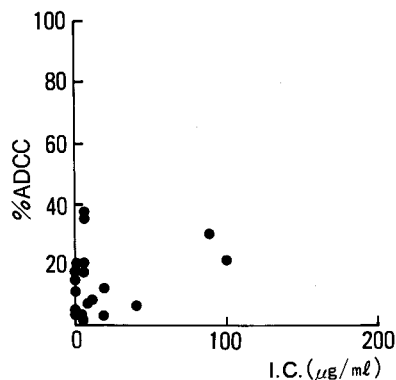


Fig. 11 Relationship between the ADCC activity of sera with hepatic diseases and immune complexes (I. C.)

5・2の方法でI. C. を測定した。セファデックス G 200 によるゲル濾過の溶出パターンおよび各分画をFig. 12の上段に示した。Fr. Iは免疫電気泳動の検討より α_2 マクログロブリン、IgG、IgA、IgMが、Fr. IIはIgG、Fr. IIIはアルブミン、トランスフェリンがその主体を占めて溶出された¹⁶⁾。Fig. 12の中段に示したように、この三症例の各分画のK cell 活性に及ぼす影響はFr. Iで平均 $37.7 \pm 11.1\%$ 、Fr. IIで $63.0 \pm 6.5\%$ 、Fr. IIIで $53.7 \pm 17.3\%$ 、Fr. IVで $73.1 \pm 5.4\%$ とFr. Iで強いK cell 活性の抑制を認めFr. II、Fr. IIIでも若干の抑制を認めた($P < 0.01$)。またこれらの分画のI. C. の値はFig. 12の下段に示すようにFr. Iで平均 $59.5 \pm 40.7 \mu\text{g/ml}$ Fr. IIで $40.0 \pm 39.2 \mu\text{g/ml}$ 、Fr. IIIおよびFr. IVには存在しなかった。

3・6・2 セファデックス G 200 ゲル濾過後の各分画のSDS-PAGE

セファデックス G 200 ゲル濾過後の β メルカプトエタノール処理した各分画のSDS-PAGE所見ではFr. IにIgGのL鎖、H鎖のバンドに加えて数本の蛋白バンドが認められ、またFr. IIには主にIgGのL鎖、H鎖と思われるバンドを認めた。Fr. IIIはアルブミン、トランスフェリンの太いバンドに加えて、数本の低分子蛋白と思われるバンドを認めた。

3・6・3 プロテイン A カラムによる検討

K cell 活性の抑制を示したセファデックス G 200 ゲ

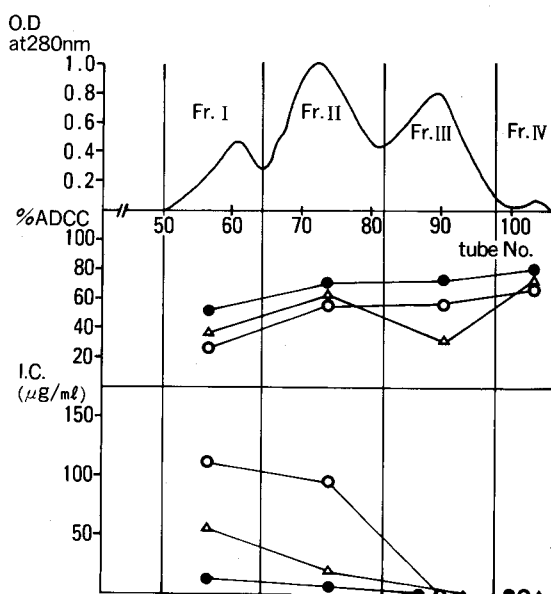


Fig. 12 Distribution of I. C. and suppressive activity of ADCC on Sephadex G 200 gel filtration.

ル濾過後の Fr. I, Fr. II, Fr. IIIについてプロテイン A カラムで検討すると Fig. 13, Table 3 に示したように Fr. I ではプロテイン A カラムに結合した分画 B に, Fr. III ではプロテイン A カラム非結合性の分画 E に K cell 活性の抑制を認めた. しかし Fr. II ではプロテイン A 非結合性の分画は認められず, また結合した部分も酢酸溶液で溶出された後は K cell 活性の抑制は認められなかった.

4 考 察

慢性活動性肝炎の発症や進展の機序に肝特異抗原に対する免疫応答が深く関与することは多くの研究によって示唆されている^{6,7,17}. しかし慢性活動性肝炎における肝細胞崩壊に関しいくつかの仮説^{18,19}が提唱されているが, その本態は必ずしも明らかではない. 近年, 慢性活動性肝炎では血中 HBs 抗原の有無にかかわらず肝特異抗原と反応する自己抗体が存在することが報告され³⁻⁵, この特異抗体と K cell とによる Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) の機序による肝細胞障害が推察されている. それは Hopf *et al.*²⁰ が HBs 抗原陰性の慢性活動性肝炎患者の肝生検組織の肝細胞表面に IgG が結合していることを蛍光抗体法で観察したことに始まり, Cochrane *et al.*⁶ が慢性活動性肝炎患者の末梢血リンパ球中に, 分離肝細胞に障害的に作用する細胞が存在することを報告し, この肝細胞に対する細胞障害性は aggregated IgG や anti-IgG, anti-IgG-Fc により抑制されたことにより K cell による ADCC 機構に基づくと考えられた. また Vogten *et al.*²¹ は Meyer *et al.*¹¹ の報告した肝特異抗原 (liver-specific protein, LSP) で被覆したハト赤血球を用いる ADCC アッセイ系で慢性活動性肝炎患者血清中の LSP に対する抗体の存在を示したことなどによっている. その後, これらの報告が整理され, 慢性活動性肝炎における肝細胞崩壊の機序については ADCC 機構がその一つの主因であることがほぼ容認されようとしており, 最近では K cell 活性と慢性活動性肝炎の病態像との関連が注目を集めている. 最近の慢性活動性肝炎における K cell 活性はヒツジあるいはニワトリ赤血球—抗ヒツジあるいはニワトリ赤血球抗体を用いたブラック法, ⁵¹Cr release 法の実験系でいくつか報告されている^{8-11,22-75}. その結果, 慢性活動性肝炎では末梢血中の K cell 活性は他の肝疾患に比較して低下しているとする報告が殆どである. しかし肝細胞を標的細胞とした時の慢性活動性肝炎における K cell 活性がどうであるかはあまり知られていない. 今回著者が用い

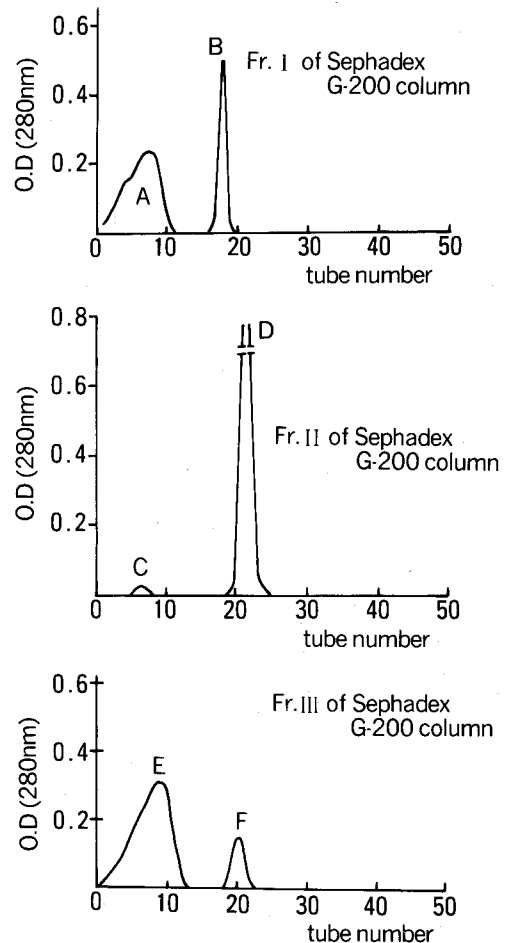


Fig. 13 Protein A Sepharose affinity chromatography of fractions obtained from Sephadex G-200 column.

Table 3 Suppressive activity of fractions from Protein A Sepharose affinity chromatography on ADCC.

Fraction	tube No.	% ADCC
A	3~8	88.9
B	18	64.2
C	6~8	97.3
D	21	92.0
E	6~11	72.5
F	19~21	93.4

た肝細胞由来の培養細胞 Chang liver cell (CLC) を用いた CLC-抗 CLC 抗体による ADCC アッセイ系において検討した結果, 慢性活動性肝炎患者の末梢血

K cell 活性は正常人, 他の肝疾患に比して有意の低下を認めた. MacSween *et al.*²⁶⁾も著者と同様に CLC を標的細胞として K cell 活性を測定し, 慢性活動性肝炎で低下していると報告している. 現在この慢性活動性肝炎患者の末梢血 K cell 活性の低下は K cell が肝内に動員された結果, 末梢血 K cell の絶対数が減少する可能性, ADCC アッセイ系のもう一つの因子である特異抗体の多寡, K cell を障害する因子などが想像されているが明らかではない. また現在用いられている ADCC アッセイ系はいずれも K cell の数と機能の両者を含めた“活性”として表現されており, この方法論の問題点のため解析を困難にしていると思われる. これらの問題点を踏まえながら著者は慢性活動性肝炎患者の末梢血 K cell 活性の低下の意義を患者血清中の特異抗体の観点から追求しようとした. Kawanishi²⁾は慢性活動性肝炎患者血清を用い, ウサギの肝細胞に対する IgG 抗体を証明し, 且つこれらの血清にウサギ肝細胞に対する ADCC 機構による障害性を認めている. そこで著者も慢性活動性肝炎患者血清中の肝に対する特異抗体の有無, すなわち ADCC 誘導能を検討した. 先のアッセイ系と同様に肝細胞由来の CLC を標的細胞とし, 抗体の起源に各種肝疾患患者血清を用い, 正常人末梢血リンパ球を効果細胞として実施した. 対照として J-III, HMV を使用し肝に対する特異性を検討したところ正常人血清の $\text{mean} \pm 2 \text{SD}$ 以上を陽性とした場合, Fig. 3 に示すように CLC に対しての細胞障害の陽性率は 51.2% と高率であり, 一方 J-III は 11.6%, HMV で 9.3% と正常人と差を認めなかった. また ADCC 誘導能を有する慢性活動性肝炎患者血清を CLC で吸収することによって, それを減少せしめたことは慢性活動性肝炎を中心とした肝疾患血清の ADCC 誘導能の肝特異性をさらに示すと思われる. またラット肝組織を用いた蛍光抗体法による検索では 52 例中 22 例が免疫蛍光陽性所見を示し, とくに肝にのみ陽性所見を示した血清は 8 例であり, それらと ADCC 誘導能との関連をみると CLC に対して高い細胞障害性が認められた. 以上の成績から慢性活動性肝炎などの患者血清には肝細胞膜抗原に対する特異的な IgG 抗体が存在すること, また *in vivo* において, これら抗体を介して K cell が肝細胞障害やその進展に関与していることが推定されるのである. 一方, 肝特異抗原に関しては Meyer zum Büschenfelde and Miescher²⁷⁾ および Sheffield and Emmelot²⁸⁾ の報告があり, 特に Meyer zum Büschenfelde and Miescher は肝細胞の可溶性分画

より高分子リボ蛋白を抽出し, それをウサギの腹腔内に注射し, 慢性肝炎を発症せしめたことは LSP の存在をより明らかにしたものである. しかし前述したような肝に特異性のある ADCC 誘導能を有する抗体が Meyer zum Büschenfelde and Miescher の LSP に対する抗体と同じか否かは現時点では明らかではない. いずれにしても今回のアッセイ系において慢性活動性肝炎を中心とした肝疾患患者血清中に ADCC を発現させる抗体の存在が示されたのである. この特異抗体の出現率を各種肝疾患別に詳細に検討したところ, 慢性活動性肝炎では 76.9% と明らかに高率を示し, 急性肝炎, 慢性非活動性肝炎, 肝硬変の一部にも陽性を示した. Flaviabortolotti *et al.*²³⁾ も患者リンパ球を用い, 急性肝炎で ADCC 活性が認められる症例あるいは慢性活動性肝炎で認められない症例を経験し, その臨床的意義に注目している. そこで ADCC 活性を発現させる肝特異抗体の出現の意義について, これら肝炎の臨床経過との関係から検討を試みた. Fig. 7 に示したように経過を追跡した 3 例の急性肝炎ではいずれの時期においても血清の ADCC 誘導能は高値を示さなかった. Fig. 8a, 8b, 8c に示すように発症初期から観察し得た慢性活動性肝炎では病勢が遷延し血清トランスアミネース値が上昇する以前に ADCC 誘導能が出現している. これらの結果は, 急性期の肝細胞の障害には ADCC 機構は関与せず, 慢性化する症例で初期の肝細胞障害による肝特異抗原の遊出に伴い症例の免疫学的背景のもとに感作, 自己抗体の産生という機作を経て K cell との共同により ADCC 機構が作動し再度の肝細胞障害を惹起するものと推察される. 従って著者の成績の急性肝炎における ADCC 誘導能陽性例はすでに肝特異抗体の産生が内在しており慢性化への進展が強く示唆されると思われる. また慢性活動性肝炎においての ADCC 誘導能陰性例は遷延化した後の肝細胞障害の認められない時期と判断されるのである. 後者については一般に慢性活動性肝炎の K cell 活性が低下していることに関連すると思われる. 二点の意味が指摘されよう. 一つは慢性活動性肝炎の K cell 又は特異抗体の減少のために肝細胞障害が縮小している患者にとっては有利な状態, いま一つは先に述べたように血清のラット肝組織に対する蛍光抗体の所見が陽性で, 肝細胞に対する IgG 抗体が存在するにもかかわらず CLC への ADCC 誘導能が陰性で慢性活動性肝炎から肝硬変に移行した症例の存在である. これらの患者の血清は EA ロゼット形成, WFB-抗 WFB 抗体アッセイ系のいずれをも抑制

したことから K cell の Fc レセプターを阻害する因子が存在する結果と考えられるのである。一般に K cell 活性は種々の要因により影響を受けるとされており、その修飾因子として immune complex (I. C.)²⁹⁻³²⁾、血清 immunoglobulin^{33,34)}、rheumatoid factor³⁵⁻³⁷⁾、complement³⁸⁾、抗リンパ球抗体などが挙げられている。これらの中で ADCC の mechanism から推察されるように I. C. による Fc レセプターの阻害が最もよく論議されており、かつ最近 systemic lupus erythematosus (SLE) や periarteritis nodosa (PN, rheumatoid arthritis (RA) などの自己免疫疾患^{37,39,41-43)} において K cell 活性の低下と、血中 I. C. 量や rheumatoid factor との相関が報告されている。慢性活動性肝炎において Flaviabortolotti *et al.*²³⁾ は K cell 活性の低下している症例の血清は正常人の K cell 活性を抑制すると報告し、I. C. を含めた血清因子による Fc レセプターの阻害を推定している。相沢ら⁴⁴⁾ は、慢性活動性肝炎では正常人に比較して末梢血の K cell 活性は低下しているが慢性活動性肝炎患者のリンパ球をトリプシンで処理することにより大部分の症例が正常域の K cell 活性値を示すようになると報告し、同様に I. C. などの血清抑制因子による K cell 膜面の阻害を重視している。しかし I. C. による Fc レセプターの阻害に関する多くの報告は aggregated IgG などによる *in vitro* のモデル実験でそれを演繹しているにすぎない^{24,25)}。わずか中野⁴⁶⁾ が慢性活動性肝炎における K cell 活性の低下と、血小板凝集試験および末梢血好中球の蛍光抗体法により測定した血中 I. C. との関連について検討し、一部症例では I. C. による Fc レセプターの阻害は考えられるが、全体として K cell 活性と I. C. の有無とは有意の相関を認めないと報告している。これまでの I. C. の測定法は種々開発されているが、それぞれの方法には問題点が指摘されており正確な I. C. の測定は困難な現況にあった。今回著者が応用した Pereira *et al.*¹⁴⁾ による固相化抗 C3 ラジオイムノアッセイ法は C1q binding assay 法⁴⁷⁾ の問題点とされる非働化によってもなお血清中に残存する C1q 活性による影響もなく、優れた方法と思われる。この方法により測定した I. C. と K cell 活性、ADCC 誘導能との相関を検討したところ I. C. と K cell 活性との間には相関係数 -0.555 と両者の相関は認められず、K cell 活性が低値の症例で I. C. が陽性となる症例が存在した。また I. C. の量と血清の ADCC 誘導能との相関係数は 0.269 であり、統計学的に相関も逆相関も認めなかつ

た。このことは慢性肝炎患者血清中には K cell 活性を抑制する因子が存在するが、それは従来論議されてきた I. C. の可能性も示唆しながら、その他にも何らかの因子の存在、すなわち抑制因子の多様性を意味すると考察されるのである。そこで著者は K cell 活性を抑制した肝硬変患者血清をセファデックス G 200 カラムを用いゲル濾過を実施し各分画の K cell 活性に及ぼす影響と I. C. の分布を検討した。その結果、抑制作用は void volume に一致して溶出される高分子分画 (第 I 分画) とアルブミンを主とする分画 (第 III 分画) に存在した。第 I 分画に関しては血清全体の抑制作用の確認の際 EA ロゼット形成を、阻害したこと、またリンパ球の Fc レセプターと同様の生物学的活性を有し IgG や I. C. に高い親和性を有するプロテイン A^{48,49)} に結合しやすいこと、固相化抗 C₃ ラジオイムノアッセイ法による測定から I. C. が分布したことより第 I 分画の抑制因子は I. C. であることが明らかとなった。一般にこれまで報告されてきた K cell 活性を抑制する I. C. は非特異的な I. C. が主体と考えられ、今回の SDS-PAGE 上の Fr. I の L, H 鎖以外の蛋白バンドがある種の抗原を含む可能性もある。しかし肝特異抗原とその抗体との I. C. についてはその分析、出現の臨床的意義など今後の課題と思われる。第 III 分画での K cell 活性の抑制は 3 例中 1 例にのみ認められた。本分画はプロテイン A に対し非結合性であり、I. C. も存在しなかった。ゲル濾過により得られたパターンについて推測する限り分子量はアルブミンに近似すると思われる。これまで免疫反応を抑制する物質として本分画に類似の分子量を持つ因子は PHA 反応、mixed lymphocyte reaction (MLR)、ヒツジ赤血球抗体産生および NK 活性を抑制する α_1 -antitrypsin⁵⁰⁾、PHA 反応、MLR を抑制する α_1 -acid glycoprotein⁵¹⁾、alpha-fetoprotein⁵²⁾、および NK 活性の抑制を示す α_1 -chymotrypsin^{53,54)} などが知られている。これらの中で NK cell と K cell の異同性が問題となっていることより、NK 活性を抑制する α_1 -antitrypsin、 α_1 -chymotrypsin が同様に K cell 活性を抑制する可能性も十分に考慮される場所である。また副腎皮質ステロイドホルモンが K cell 活性を抑制するという報告⁵⁵⁾ があり、血清中でこれがアルブミンを輸送蛋白としていることも知られ、両者を考え合わせる時、第 III 分画の本態がステロイドホルモンであることも予想される。慢性活動性肝炎に対しての副腎皮質ステロイドホルモンの使用との関連の整理も必要と思われ、今後の分析が必要であろう。以

上慢性活動性肝炎患者血清中には肝細胞膜と特異的に反応する自己抗体が存在し、これを介する ADCC 機構により肝細胞破壊が起こるが、同時に ADCC 機構を抑制する血清因子が存在し、この抑制因子により肝細胞破壊の進行が制御されていると考えられる。さらに抑制因子は I. C. と他の物質があり、これらの消長が病態像の形成に如何に関与するか臨床的にも重要な課題と思われる。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲下さった本学内科学第4講座、漆崎一郎教授、石谷邦彦講師に深謝致します。

5 結 論

慢性活動性肝炎患者の末梢血リンパ球の ADCC (K cell) 活性および血清の ADCC 誘導能を検討し、更に患者血清中に存在した ADCC 抑制因子の生化学的分析を行った。

1 標的細胞に CLC, その特異抗体を用いた時の慢性活動性肝炎患者の K cell 活性は正常人および他の肝疾患に比較して有意に低下していた。

2 各種培養細胞 CLC, J-III, HMV に対する肝疾患患者血清の ADCC 誘導能の発現は CLC に対して高率であり標的細胞選択性を認めた。

3 ラットの各種臓器を用いた蛍光抗体法および CLC による ADCC 活性の吸収試験より ADCC 誘導能陽性の血清には肝特異抗体が存在すると考えられた。

4 標的細胞を CLC とした場合の各種肝疾患患者血清の ADCC 誘導能の発現は慢性活動性肝炎に高率に認められた。

5 肝炎患者血清の ADCC 誘導能と血清トランスアミネース値の関連を検討すると慢性活動性肝炎患者4例中3例の ADCC 誘導能は血清トランスアミネース値の上昇に先立って陽性となり、その後は軽快増悪に並行する推移を示した。

6 肝疾患血清中の I. C. はとくに慢性活動性肝炎において高値を示した。

7 肝疾患患者の K cell 活性と血清 I. C. との相関係数は -0.555 であり、I. C. が高値の症例で若干、K cell 活性が低値を示す、すなわち逆相関の傾向を認めた。一方、血清の ADCC 誘導能と I. C. との相関は認められなかった。

8 K cell 活性抑制を示した血清をセファデックス G 200 カラムで分画し、各々につき更に K cell 活

性の抑制を検討すると、第 I 分画と第 III 分画に抑制作用を認めた。

9 セファデックス G 200 ゲル濾過による第 I 分画の K cell 活性抑制因子はプロテイン A カラムによる検討および I. C. の測定より、I. C が主体であると考えられた。

10 第 III 分画の K cell 活性抑制因子は α_1 -antitrypsin, α_1 -acid glycoprotein, alpha-fetoprotein, α_1 -chymotrypsin およびステロイドホルモンの可能性が考えられた。

文 献

1. Meyer zum Büschenfelde, K. H., Manns, M., Hütteroth, T. H., Hopf, U. and Arnold, W. : LM-Ag and LSP-two different target antigens involved in the immunopathogenesis of chronic active hepatitis? Clin. Exp. Immunol. **37**, 205-212 (1979).
2. Kawanishi, H. : *In vitro* studies on IgG-mediated lymphocyte cytotoxicity in chronic active liver disease. Gastroenterology **73**, 549-555 (1977).
3. Hütteroth, T. H. and Meyer zum Büschenfelde, K. H. : Clinical relevance of the liver-specific lipoprotein (LSP). Acta Hepato-Gastroenterol. **25**, 243-253 (1978).
4. Jensen, D. M., McFarlane, I. G., Portmann, B. S., Path, M. R. C., Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R. : Detection of antibodies directed against a liver-specific membrane lipoprotein in patients with acute and chronic active hepatitis. N. Engl. J. Med. **299**, 1-7 (1978).
5. Kakumu, S., Arakawa, Y., Goji, H., Kashio, T. and Yata, K. : Occurrence and significance of antibody to liver-specific membrane lipoprotein by double-antibody immunoprecipitation method in sera of patients with acute and chronic liver diseases. Gastroenterology **76**, 665-672 (1979).
6. Cochrane, A. M. G., Moussouros, A., Thomson, A. D., Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R. : Antibody-dependent cell-mediated (K cell) cytotoxicity against isolated hepatocytes in chronic active hepatitis. Lancet **1**, 441-444 (1976).
7. Kawanishi, H. and MacDermott, R. P. : K-cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in chronic active liver disease. Gastroenterology **76**, 151-158 (1979).
8. Biberfeld, P., Wahlin, B., Perlmann, P. and Biberfeld, G. : A plaque technique for assay and characterization of antibody-dependent cytotoxic effector (K) cells. Scand. J. Immunol. **4**, 859-864

- (1975).
9. Imir, T., Saksela, E. and Mäkelä, O. : Two types of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, arming and sensitization. *J. Immunol.* **117**, 938-1942 (1976).
 10. 銭谷幹男, 高橋弘, 出浦正倫, 清水能一, 相沢良夫, 秋庭真理子, 齊藤礼郎, 飛鳥田一朗, 三枝苗成, 亀田治男 : 慢性肝疾患に於ける末梢リンパ球中 K-cell population-マイクロプレート法による検討- 肝臓 **19**, 1188 (1978).
 11. 野々村昭孝, 太田五六 : 慢性活動性肝炎患者末梢血リンパ球の K-cell 活性. 消化器と免疫 **5**, 271-277 (1980).
 12. 佐藤昇志, 藤原太郎, 石井良文 : ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) の基礎的研究 (第 1 編) ADCC 測定法の改良と発現条件の検討 フレムギー **26**, 740-748 (1977).
 13. Takasugi, M. and Klein, E. : A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation* **9**, 219-227 (1970).
 14. Pereira, A. B., Theofilopoulos, A. N. and Dixon, F. J. : Detection and partial characterization of circulating immune complexes with solid-phase anti-C3. *J. Immunol.* **125**, 763-770 (1980).
 15. Maizel, J. V. : Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Methods Virol.* **5**, 179-186 (1971).
 16. Natori, H. : Physicochemical analyses of vitamin B12 binding proteins in sera, gastric juice, and leucocytes. *Tumor Res.* **6**, 1-79 (1971).
 17. 新谷寿久, 野々村昭孝, 太田五六, 小林健一, 加登康洋, 杉岡五郎 : 慢性肝疾患患者のリンパ球肝細胞障害能について. 日消誌 **75**, 28-33 (1978).
 18. Dudley, F. J., Fox, R. A. and Sherlock, S. : Cellular immunity and hepatitis-associated, Australia antigen-liver disease. *Lancet* **1**, 723-726 (1972).
 19. Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R. : Inadequate antibody response to HB Ag or suppressor T-cell defect in development of active chronic hepatitis. *Lancet* **2**, 1543-1545 (1974).
 20. Hopf, U., Meyer zum Büschenfelde, K. H. and Arnold, W. : Detection of a liver-membrane autoantibody in HBs Ag-negative chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.* **294**, 578-582 (1976).
 21. Vogten, A. J. M., Hadzic, N., Shorter, R. G., Summerskill, W. H. J. and Taylor, W. F. : Cell-mediated cytotoxicity in chronic active liver disease : A new test system. *Gastroenterology* **74**, 883-889 (1978).
 22. Perlmann, P. and Holm, G. : Cytotoxic effects of lymphoid cells *in vitro*. *Adv. Immunol.* **11**, 117-193 (1969).
 23. Flaviabertolotti, Realdi, G., Diodati, G. and Giovannafattovich : Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in acute hepatitis B and in chronic active hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* **33**, 211-216 (1978).
 24. 中野護 : 肝疾患における antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) に関する研究. 第 1 報 基礎的検討. 肝臓 **21**, 1444-1451 (1980).
 25. Eckhardt, R., Kloos, P., Dierich, M. P. and Meyer zum Büschenfelde, K. H. : K-lymphocytes (Killer-cells) in Crohn's disease and acute virus B-hepatitis. *Gut* **18**, 1010-1016 (1977).
 26. MacSween, R. N. M., Sandilands, G. P., Thomas, M. A., Holden, R. and Watkinson, G. : Peripheral blood 'K' cells and antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity in chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Digestion* **14**, 532 (1976).
 27. Meyer zum Büschenfelde, K. H. and Miescher, P. A. : Liver specific antigens. Purification and characterization. *Clin. Exp. Immunol.* **10**, 89-102 (1972).
 28. Sheffield, J. B. and Emmelot, P. : Studies on plasma membranes. XVI. Tissue specific antigens in the liver cell surface. *Exp. Cell Res.* **71**, 97-105 (1972).
 29. Dicklor, H. B. : Studies of the human lymphocyte receptor for heat-aggregated or antigen-complexed immunoglobulin. *J. Exp. Med.* **140**, 508-522 (1974).
 30. Howat, J. M. T., Moore, M., Hilton, A. M. and Kimber, I. : Inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by artificial immune complexes and pathological sera. *Immunology* **37**, 467-475 (1979).
 31. Baldwin, R. W., Price, M. R. and Robins, P. A. : Blocking of lymphocyte-mediated cytotoxicity for rat hepatoma cells by tumor-specific antigen-antibody complexes. *Nature (New Biol.)* **238**, 185-187 (1972).
 32. Theofilopoulos, A. N., Dixon, F. J. and Bokisch, V. A. : Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. I. Characterization of receptors for IgG Fc and complement and description of the binding mechanism. *J. Exp. Med.* **140**, 877-894 (1974).
 33. Mac Lennan, I. C. M. and Harding, B. : Some characteristics of immunoglobulin involved in antibody dependent lymphocyte cytotoxicity. *Br.*

- J. Cancer **28**(Suppl. 1), 7-10 (1973).
34. Scornik, J. C., Cosenza, H., Lee, W., Köhler, H. and Rowley, D. A.: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. I. Differentiation from antibody-independent cytotoxicity by "normal" Ig G. J. Immunol. **113**, 1510-1518 (1974).
 35. Hallberg, T.: In vitro cytotoxicity of human lymphocytes for sensitized chicken erythrocytes is inhibited by sera from rheumatoid arthritis patients. Scand. J. Immunol. **1**, 329-338 (1972).
 36. Winchester, R. J., Winfield, J. B., Siegal, F., Wernet, P., Bentwich, z. and Kunkel, H. G.: Analyses of lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. **54**, 1082-1092 (1974).
 37. Diaz-Jouanen, E., Bankhurst, A. D., Messner, R. P. and Williams, JR., R. C.: Serum and synovial fluid inhibitors of antibody-mediated lymphocyte toxicity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **19**, 142-149 (1976).
 38. Faith, A., Unger, A., Kalsi, J. S. and Panayi, G. S.: A comparison of two techniques for the detection of an antibody in human serum to Chang liver cell surface antigens. J. Immunol. Methods **34**, 117-126 (1980).
 39. Feldmann, J. L., Becker, M. J., Moutsopoulos, H., Fye, K., Blackman, M., Epstein, M. V. and Talal, N.: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in selected autoimmune diseases. J. Clin. Invest. **58**, 173-179 (1976).
 40. Zvaifler, N. J. and Bluestein, H. G.: Antibody-mediated suppression of antibody-dependent cytotoxic effector cell function. Clin. Immunol. Immunopathol. **13**, 277-286 (1979).
 41. Scheinberg, M. A. and Cathcart, E. S.: Antibody-dependent direct cytotoxicity of human lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. **24**, 317-322 (1976).
 42. Fye, K. H., Becker, M. J., Theofilopoulos, A. N., Moutsopoulos, H., Feldman, J. L. and Talal, N.: Immune complexes in hepatitis B antigen-associated periarteritis nodosa. Am. J. Med. **62**, 783-791 (1977).
 43. McGill, P. E. and Twinn, I.: Antibody-mediated cytotoxicity in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. **36**, 268-270 (1977).
 44. 相沢良夫, 高橋弘, 出浦正倫, 清水能一, 銭谷幹男, 秋庭真理子, 斉藤礼郎, 飛鳥田一朗, 三枝苗成, 亀田治男: 肝疾患に於ける K-cell 動態について—Proteolytic enzyme 処理による検討— 肝臓 **20**, 973 (1979).
 45. 野々村昭孝, 新谷寿久, 太田五六: 慢性活動性肝炎における Ig G-antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity について. 日消誌 **75**, 1315-1357 (1978).
 46. 中野護: 肝疾患における antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) に関する研究. 第3報末梢血リンパ球の ADCC 活性と circulating immune complex の関連性. 肝臓 **21**, 1459-1465 (1980).
 47. Zubler, R. H., Lange, G., Lambert, P. H. and Miescher, P. A.: Effect of heating on the binding of Clq by immune complexes and application of the test to systemic lupus erythematosus. J. Immunol. **116**, 232-235 (1976).
 48. Kronvall, G., Seal, U. S., Finstad, J. and Williams, R. C.: Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of rG globulin using staphylococcal protein A. J. Immunol. **104**, 140-147 (1970).
 49. Austin R. M. and Daniels, C. A.: Interaction of staphylococcal protein A with virus-Ig G complexes. J. Immunol. **113**, 1568-1574 (1974).
 50. 石谷邦彦, 前口邦雄, 呉禎吉, 本多利雄, 竹内秀一, 添崎一朗: 癌患者血清 α_1 -antitrypsin の細胞性免疫抑制作用について. 医学のあゆみ **108**, 92-93 (1979).
 51. Bennett, M. and Schmid, K.: Immunosuppression by human plasma α_1 -acid glycoprotein: Importance of the carbohydrate moiety. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 6109-6113 (1980).
 52. 石谷邦彦, 近藤敦, 前口邦雄, 赤沢修吾, 呉禎吉, 長井忠則, 吉田憲基, 田村升, 添崎一朗: Alpha-fetoprotein の PHA 反応抑制機構に関する研究. 臨床免疫 **9**, 1026-1032 (1977).
 53. Koide, Y. and Takasugi, M.: Determination of specificity in natural cell-mediated cytotoxicity by natural antibodies. J. Natl. Cancer Inst. **59**, 1099-1105 (1977).
 54. Kay, H. D., Bonnard, G. D., West, W. H. and Herberman, R. B.: A functional comparison of human Fc-receptor-bearing lymphocytes active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Immunol. **118**, 2058-2066 (1977).
 55. 高橋弘, 出浦正倫, 清水能一, 相沢良夫, 銭谷幹男, 秋庭真理子, 斉藤礼郎, 飛鳥田一朗, 三枝苗成, 亀田治男: 副腎皮質ステロイドの K-cell population 抑制に関する検討. 肝臓 **21**, 75 (1980).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第4講座 竹内秀一